

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における細胞内遊離 Ca^{2+} イオンの発生生理学的意義に関する研究

著者	阿部 知顕
号	1192
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/25142

氏名・(本籍)	あ 阿	べ 部	とも 知	あき 顕
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理	博	第 1 1 9 2 号	
学位授与年月日	平	成	3 年 1 月 23 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻			
学位論文題目	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> における細胞内遊離 Ca ²⁺ イオンの発牛生理学的意義に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教	授	大 橋 広 好	教 授 竹 内 拓 司
				助 教 授 前 田 靖 男

論 文 目 次

要 旨

序 章

第 1 章 粘菌細胞の走化性運動における細胞内遊離 Ca²⁺イオンの役割に関する研究

1. 序 論

2. 材料と方法

3. 結 果

4. 考 察

5. 引用文献

第 2 章 単層培養系における粘菌細胞の分化への細胞内 Ca²⁺イオンの関与について

1. 序 論

2. 材料と方法

3. 結 果

4. 考 察

5. 引用文献

第3章 総合討論

謝 辞

論文内容要旨

序 章

細胞外から与えられた情報がどのようにして細胞内に伝わり種々の反応が誘起されるのか、その細胞内情報伝達の機構が近年注目されている。動物細胞などでの研究から得られた知見では、細胞内情報伝達にはいくつかの経路があり A キナーゼ系、C キナーゼ系、イノシトール 3 リン酸 (IP_3) 系、などが知られている。これらの伝達系では細胞内 Ca^{2+} が重要であることが指摘されており、例えば IP_3 系では第 2 情報伝達物質として細胞内 Ca^{2+} が機能していることが知られている (Streb et al., 1983)。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、細胞分化や細胞運動の機構の解析のためによく用いられている生物である。粘菌細胞は生長期には単核のアメーバとして増殖するが、周囲に栄養源がなくなると 3', 5'-サイクリック AMP (cAMP) を自ら合成・分泌し、それへの走化性運動によって集合して多細胞体 (移動体) を形成する。移動体ではその前後軸に沿って比較的単純な分化パターンが認められ、この分化調節には DIF (differentiation inducing factor) をはじめとする数種の因子が関与していることが示唆されている。

走化性運動の過程において、細胞表面にある cAMP 受容体からの情報伝達に IP_3 系が介在することが *in vitro* の実験系で最近明らかにされた (Europe-Finner and Newell, 1985, 1986)。このような背景のなかで、以前から指摘されていた、細胞分化やエンドサイトーシスなどの過程における細胞内 Ca^{2+} の重要性 (Maeda, 1970 ; Maeda and Maeda, 1973 ; Maeda and Kawamoto, 1986) がますます注目されるに至った。細胞内での Ca^{2+} の機能を知るためには、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定し、その動的变化を明らかにすることが必要であるが、粘菌細胞においては $[Ca^{2+}]_i$ の測定すらこれまで成功していなかった。これは主として、粘菌細胞の膜透過性が低く、 Ca^{2+} 指示薬を細胞内に入れることが困難であったことによる。

そこで本研究では、粘菌細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の測定法を確立し、走化性運動や細胞分化の過程での $[Ca^{2+}]_i$ の動態を調べることによって、 Ca^{2+} の発牛生理学的意義をより明らかにすることを目的とした。第 1 章では、粘菌細胞に電氣的穿孔 (エレクトロポレーション) によって細胞外の物質を導入する方法を確立し、この方法を用いて定常的な $[Ca^{2+}]_i$ 値を決定した。また、細胞の走化性運動および多細胞体の極性運動における細胞内 Ca^{2+} の役割を知るため、 $[Ca^{2+}]_i$ への cAMP の影響等を調べた。第 2 章では粘菌細胞の分化への Ca^{2+} の関与を探るため、細胞外から加えた薬剤の効果が現れやすい単層培養法を用い、 $[Ca^{2+}]_i$ を変化させる可能性の高い、 Ca^{2+} 拮抗剤 TMB-8 をはじめとするいくつかの薬剤を投与して、分化形質発現および $[Ca^{2+}]_i$ へのそれらの影響を調べた。なお、この研究の過程で、分化検定系としての単層培養法の問題点、および DIF の機能に関して従来の見解とは異なる新たな可能性が提示された。

第1章 粘菌細胞の走化性運動における細胞内遊離 Ca^{2+} イオンの役割に関する研究

1. 序 論

走化性運動における Ca^{2+} イオンの役割を明らかにするために、まず粘菌細胞の生長期および集合期の細胞の定常的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定し、また走化性物質 (cAMP) やカフェインの投与に伴う $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を追跡した。さらに、多細胞体 (移動体) の極性運動の仕組みを知る目的で、移動体前部 (予定柄細胞) と後部 (予定胞子細胞) における定常的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、cAMP 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化、および cAMP 刺激に伴う細胞骨格アクチン量の変化を比較検討した。

2. 材料と方法

D. discoideum, Ax-2 株および V12M2 株を用いた。Ax-2 株は液体栄養培地である HL-5 培地中での振盪によって、また V12M2 株は栄養寒天培地上での細菌 *Klebsiella aerogenes* との 2 員培養によって増殖させた。集合期細胞としては生長期の細胞をリン酸緩衝液中で 5-9 時間振盪したものを用いた。移動体の分散細胞は酵素 (プロナーゼ・BAL) 処理によって得られた。これらの細胞に電氣的穿孔によって Ca^{2+} 蛍光指示薬クイン 2 およびフラー 2 を導入し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定を試みた。クイン 2 を用いた測定では、細胞懸濁液の状態で蛍光光度計で測定し、懸濁された細胞の平均的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を決定した。また、フラー 2 を用いた測定では、SIT カメラまたは光電子増倍管による顕微蛍光測光により、単細胞レベルでの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を行なった。細胞骨格アクチンに関しては、ポリアクリルアミド電気泳動法によりアクチンを分画し、デンシトメトリーによりその量を決定した。

3. 結 果

電氣的穿孔による粘菌細胞への細胞外の物質の導入には、比較的低電圧で長時間のパルスが適することがわかった。この方法はまた、 Ca^{2+} 指示薬に限らずタンパク質などの高分子の導入にも広く適用できることが示された。 Ca^{2+} 指示薬が導入された細胞を用いての $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定によると、生長期および集合期の細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は約 50 nM であった。これらの細胞にカフェインを投与すると細胞外の Ca^{2+} の有無に関わらず $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が認められた。また、cAMP への走化的感受性をもつ集合期細胞に cAMP を投与すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が急速に増加して約 4 倍に達し、その後徐々に定常レベルに戻ることに明らかにされた。

移動体の分散細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した結果、先端部の予定柄細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、後部の予定胞子細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の約 2 倍であり、cAMP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇も予定柄細胞においてより顕著であることが示された。また、細胞骨格アクチン量はこの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と時間的に一致して変化し、この変化は予定柄細胞において特に顕著であった。

4. 考 察

集合期細胞では cAMP 投与により急速で一過的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が確認されたが、この変化は cAMP 刺激に呼応した細胞運動 (仮足形成) とタイミングがほとんど一致している。このことは、cAMP 受容後の情報伝達に IP_3 系が機能しているという考えを強く支持している。cAMP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞外の Ca^{2+} の有無とは無関係に起こることから考えて、細胞内 Ca^{2+}

プールからの Ca^{2+} 放出によって細胞内遊離 Ca^{2+} が増加すると結論された。粘菌細胞における Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 放出はまた、動物細胞におけると同様、カフェインによって誘導されることが確認された。

予定柄細胞の cAMP 刺激に伴う $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と、細胞骨格アクチン量の変化とはタイミング的に一致しており、また、定常的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および cAMP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の程度は両者とも予定柄細胞においてより高いことが示された。このことは、移動体の極性運動が主として先端部の予定柄細胞によって Ca^{2+} を介してオーガナイズされる可能性を強く示唆している。

第2章 単層培養系における粘菌細胞の分化への細胞内 Ca^{2+} イオンの関与について

1. 序 論

移動体の先端部の予定柄細胞では後部の予定胞子細胞よりも細胞内の総カルシウム量が多いことが知られており (Maeda and Maeda, 1973), 実際に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が予定柄細胞において高いことが今回示された。そこで、細胞内 Ca^{2+} が、細胞型の決定過程に関与する可能性を検討するために、細胞外から加えた薬剤の効果が現れやすい単層培養系を用い、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に影響すると考えられる薬剤 (Ca^{2+} 拮抗剤 TMB-8; Ca^{2+} チャンネルブロッカー, ニフェジピン; Ca^{2+} イオノフォア, A23187) を与えて分化形質発現への影響を調べた。

2. 材料と方法

D. discoideum, V12M2 を用いた。単層培養は Kay and Trevan (1981) の方法を一部改変して行なった。高密度条件では 1×10^5 cells/cm² の密度で、低密度条件では 7.5×10^2 cells/cm² の密度となるように cAMP を含む塩溶液に懸濁して組織培養皿にまいて培養した。低密度条件では、精製した DIF を加える実験も行なった。細胞型の決定に際しては、胞子外皮および予定胞子特異液胞 (prespore specific vacuole: PSV) と特異的に結合する蛍光抗胞子抗体によって細胞を染色し落射蛍光顕微鏡下で観察した。また、透過型電子顕微鏡による微細構造の観察も行なった。

3. 結 果

高密度での単層培養において、液胞化して柄細胞的な特徴をもつようになった細胞を、蛍光抗胞子抗体で染色すると、細胞表面に胞子外皮の一部と思われるパッチ状の染色が認められた。電子顕微鏡観察によると、柄細胞のように見える液胞化した細胞の表面には PSV の裏打ち膜由来の胞子外皮 (PSV がエクソサイトーシスされることによって形成される) が実際に存在することがわかった。低密度での単層培養に DIF を加えた場合にも同様の現象が認められた。

単層培養において TMB-8 を投与すると、予定胞子細胞の分化が抑制され、また既に分化した予定胞子細胞では PSV の消失が誘導されることが示された。ちなみに、TMB-8 には、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる効果が認められた。

4. 考 察

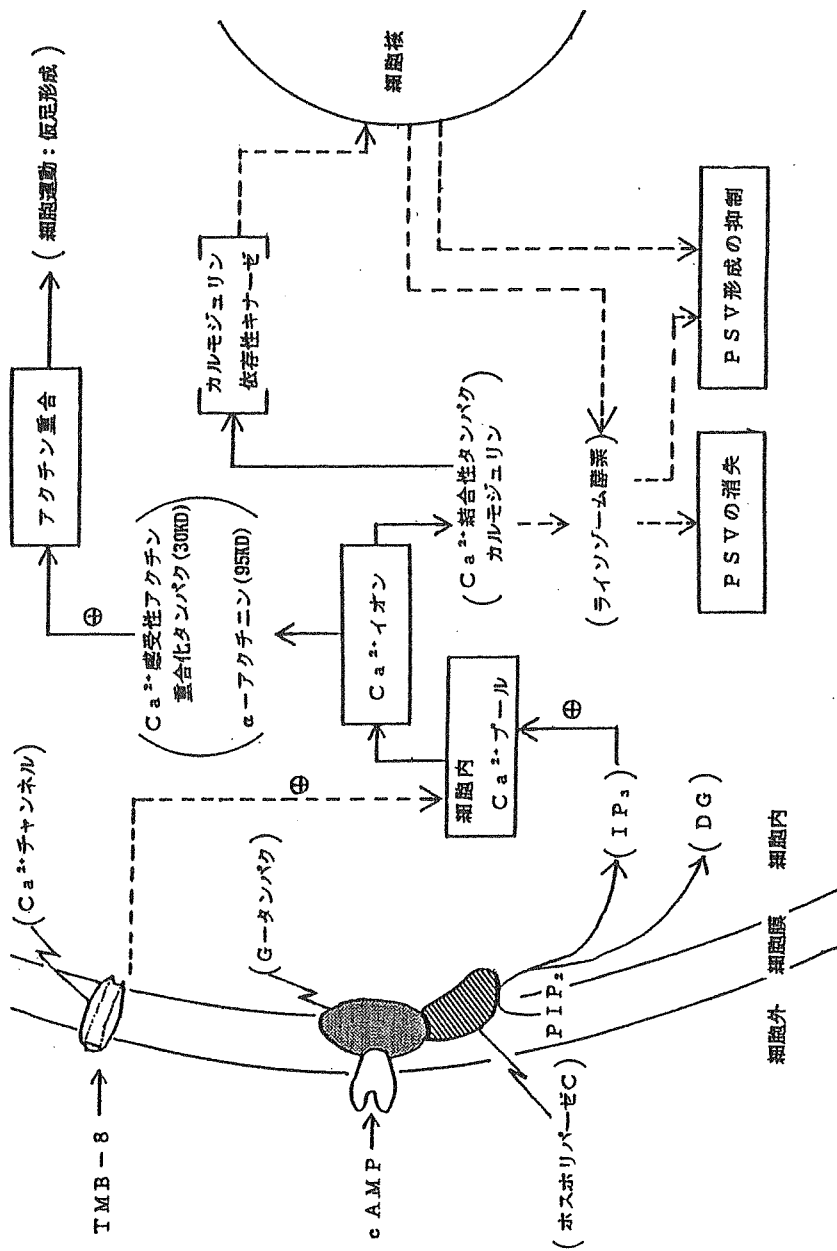
単層培養への TMB-8 の投与によって得られた結果は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高くなることが予定胞子細

胞に特異的な分化形質の発現あるいは維持に阻害的であることを示しており、細胞内 Ca^{2+} が細胞型の決定および維持に関与する可能性が強く示唆された。

単層培養した細胞では柄細胞と孢子の分化形質を合わせもつ「中間型」の細胞が形成され、このような現象は DIF を投与して液胞化を誘導した場合にも認められた。したがって、単層培養法で形成される細胞型はそれほど明確なものではなく、この方法は分化の検定系として問題があるといえる。また、予定柄細胞および柄細胞の分化誘導能をもつモルホゲンとしてこれまで注目されてきた DIF の機能に関しても新たな疑問が提示された。すなわち、DIF は細胞型の決定過程に関与しているというよりはむしろ細胞膜と液胞膜との融合（エクソサイトーシス）や、液胞膜どうしの融合（液胞の巨大化）を誘導している可能性が高いのである。

第3章 総合討論

cAMP への走化性運動に関する細胞内情報伝達系のモデルを添付の図に示す。このモデルは、本研究および関連する研究（例、Newell, 1988）によって得られた知見を基礎にして作成したものだが、図中に示すような Ca^{2+} を介する情報の流れがあると考えられる。しかしながら、不明確な点も多くあり、今後の研究課題として残されている。特に、細胞分化の方向性が決定される過程において Ca^{2+} が具体的にどのような機能を果たすかについては、今後、分化型を明確に検定できるアッセイ系を開発し、それによって Ca^{2+} の役割をさらに検討する必要があると考える。



粘菌細胞の運動および分化に関する情報伝達系のモデル

□ で囲んだ部分が本研究で示された結果を示す。() 内の物質や現象は粘菌細胞でこれまでに知られているものとし、[] 内のものはその存在が予測されるものを示す。

論文審査の結果の要旨

本論文は、種々の生体機能における細胞内 Ca^{2+} イオンの役割を、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の発生・分化系を用いて明らかにすることを目的としており、そのために細胞内遊離 Ca^{2+} イオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定法の確立が試みられ、粘菌細胞の走化性運動や細胞分化の過程における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の動態が調べられている。その結果、以下に示すような重要な知見がいくつか得られている。

1) 粘菌細胞の細胞膜を透過しない、 Ca^{2+} 指示薬をはじめとする細胞外物質を人為的に導入するため、エレクトロポレーションによる導入方法がまず確立され、これによって細胞の定常的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は約 50 nM であることが示された。これは粘菌細胞において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定に成功した最初の例である。

2) 走化性物質である 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の刺激によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がきわめて急速かつ顕著に上昇することを *in vivo* の系ではじめて実証し、走化性運動の過程において Ca^{2+} が主要な細胞内メッセンジャーとして機能していることを明確にした。

3) 多細胞体(移動体)前部の予定柄細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は後部の予定胞子細胞のそれより約 2 倍高く、cAMP 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇も前者においてより顕著であることを明らかにした。また、細胞運動に必須の細胞骨格アクチンもこの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と時間的に一致して量的変化をし、この変化は予定柄細胞において特に顕著であることを示した。これらの事実から、移動体の極性運動が主として先端部の予定柄細胞によってオーガナイズされ、この過程に Ca^{2+} が深く関与する可能性が示唆された。

4) 細胞の単層培養において、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる条件下では予定胞子細胞の分化が阻害されることを明らかにし、細胞内 Ca^{2+} が分化の方向性の決定に関与しうることを示した。

5) 柄細胞分化誘導因子として知られている DIF (differentiation inducing factor) の存在下では、従来の報告とは異なり、柄細胞と胞子の分化形質を合わせもつ「中間型」の細胞が形成されることを明らかにした。このことから、DIF は細胞型の決定のプロセスよりはむしろ、液胞膜と細胞膜との融合(エクソサイトーシス)や液胞膜どうしの融合(液胞の巨大化)に関与する可能性の高いことが示された。

本研究で明らかにされた以上の事実はいずれも全く新しいものであり、その学問的価値はきわめて高いといえる。また、当学位申請者は自立して研究を行うに必要な高度の研究能力と学識を有している。よって、阿部知顕提出の論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。